



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12Q 1/68	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/01581 (43) Date de publication internationale: 20 janvier 1994 (20.01.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00675 (22) Date de dépôt international: 2 juillet 1993 (02.07.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/08253 3 juillet 1992 (03.07.92) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR). INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75015 Paris (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement) : PANNETIER, Christophe [FR/FR]; 12, boulevard Vincent-Auriol, F-75013 Paris (FR).		(74) Mandataire: MARTIN, Jean-Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: METHOD FOR DETERMINING THE NUCLEOTIDE SIZE OF DNA FRAGMENTS (54) Titre: PROCEDE DE DETERMINATION DE LA TAILLE EN NUCLEOTIDES DE FRAGMENTS D'ADN (57) Abstract <p>A method for determining the nucleotide size of DNA fragments separated by gel electrophoresis, comprising the steps of (i) measuring the migration time of each detected DNA fragment, and (ii) correlating the size of each detected DNA fragment with its migration time.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne un procédé de détermination de la taille en nucléotides de fragments d'ADN séparés par électrophorèse sur gels caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes qui consistent à: i) mesurer le temps de migration de chaque fragment d'ADN détecté, et ii) établir une corrélation entre la taille de chaque fragment d'ADN détecté et le temps de migration de celui-ci.</p>		

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-507365

(43) 公表日 平成8年(1996)8月6日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

片内整理番号

F I

G 0 1 N 27/447

C 1 2 Q 1/68

G 0 1 N 33/50

Z 9453-4B

P 8310-2J

7363-2J

7363-2J

G 0 1 N 27/26

3 1 5 Z

3 2 5 E

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-503021

(86) (22) 出願日 平成5年(1993)7月2日

(85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)1月4日

(86) 国際出願番号 P C T / F R 9 3 / 0 0 6 7 5

(87) 国際公開番号 W O 9 4 / 0 1 5 8 1

(87) 国際公開日 平成6年(1994)1月20日

(31) 優先権主張番号 9 2 / 0 8 2 5 3

(32) 優先日 1992年7月3日

(33) 優先権主張国 フランス (FR)

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP, US

(71) 出願人 アンスティチュ ナショナル ド ラ サ
ンテ エ ド ラ ルシエルシュ メディ
カル (アンセルム)

フランス国 75013 パリ リュ ド ト
ルビアック 101

(71) 出願人 アンスティチュ パスツール
フランス国 75015 パリ リュ デュ
ドクトゥール ルー 28

(72) 発明者 パヌチエ, クリストフ
フランス国 75013 パリ ヴァンサン
オリオール プールヴァール 12

(74) 代理人 弁理士 竹沢 荘一 (外1名)

(54) 【発明の名称】 DNAフラグメントのヌクレオチドのサイズの測定方法

(57) 【要約】

本発明は、i) 各検知DNAフラグメントの移入時間を測定し、そして、ii) 各検知されたDNAフラグメントのサイズを、その移入時間で補間する工程により特徴づけられる；ゲル電気泳動法により分離されたDNAフラグメントのヌクレオチドサイズの測定方法である。

【特許請求の範囲】

1. i) 各検知DNAフラグメントに対して、予め決めた一定の長さで、移入時間を測定し、そして、

ii) 各検知されたDNAフラグメントのサイズを、その移入時間で補間することによる段階を有することにより特徴づけられるゲル電気泳動法により分離されたDNAフラグメントのヌクレオチドサイズの測定方法。

2. 各検知DNAフラグメントのサイズ(L)と移入時間との間の補間法は、以下の法則に：

$$L(t) = A \exp[-B/(t+t_0)] + C$$

(但し、A、B、Cは定数であり、tは移入時間を示し、時間定数を表わしている)

基づいて決められることを特徴とする請求項1に記載の測定方法。

3. 各検知されたDNAフラグメントのサイズ(L)とその移入サイズとの間の補間法は、次の法則；

$$L(t) = A \exp[-B/t] + C$$

(但し、A、B、Cは定数であり、tは移入時間を示す)に基づいて決められることを特徴とする請求項1或いは2に記載の測定方法。

4. 既知のサイズの標準値は、ゲル上でのコード位置決めされ、次の関数

$$f(A, B, C) = \sum_{i=1}^n [L_i - (A \exp(-B/t_i) + C)]^2$$

(但し、 L_i は、析出されたサイズ標準値の既知の長さを示し、 t_i は、各これらの既知の標準値の移入時間を示す)

のA、B、Cに対するフラクシオン偏差値は、零である場合、係数A、B、Cの値は、既知サイズの標準値に対して計算されることを特徴とする請求項2或いは

3に記載の測定方法。

5. 既知サイズの標準値は、所望のiピークが得られるまで、徐々に低減される閾値を有する調整できる測定ウィンド中で検知された測定曲線を比較すること

より、自動的に得られることを特徴とする請求項4に記載の測定方法。

6. 既知のサイズの標準値は、マニュアルで取得されることを特徴とする請求項4に記載の測定方法。

7. 係数A、B、Cは、次の式に

$$\begin{aligned} & \frac{n}{\sum_{i=1}^n (L_i - L) \exp(-B/t_i)} \times \\ & \frac{\sum_{i=1}^n (\exp(-B/t_i) - \exp(-B/t)) \exp(-B/t_i) 1/t_i}{\sum_{i=1}^n (L_i - L) \exp(-B/t_i) 1/t_i} \times \\ & \frac{n}{\sum_{i=1}^n (\exp(-B/t_i) - \exp(-B/t)) \exp(-B/t_i)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} A &= \frac{\sum_{i=1}^n (L_i - L) \exp(-B/t_i)}{\sum_{i=1}^n (\exp(-B/t_i) - \exp(-B/t)) \exp(-B/t_i)} \\ C &= 1 / n \sum_{i=1}^n (L_i - A \exp(-B/t_i)) \end{aligned}$$

(但し、 $X(t)$ は、 t_i 値に対する関数Xの平均値を示し：

$$X(t) = (1/n) \sum_{i=1}^n (L_i - A \exp(-B/t_i))$$

である) に基づいて決めることを特徴とする請求項4～6のいずれかに記載の測

定方法。

8. 係数A、B、Cは、各考えられるサイズ標準値に対して適用され、式

$$L(t) = A \exp \left[-B / (t + t_0) \right] + C$$

にし、このようにして得られたサイズ値は、既知のサイズ値と比較され、係数A、B、Cの計算の処理を続け、測定サイズと標準値の既知サイズとの間の誤差は、所定の閾値を超える場合に、最適化するために、既知サイズ値と比較されることを特徴とする請求項4～7のいずれかに記載の測定方法。

9. 更に、各測定レーンに対して、既知サイズの標準値の測定される t_i 位置を補間することにより、係数A、B、Cを測定し、そして、該補間から得られる t_i 値から、係数A、B、Cを計算することを特徴とする請求項4～8のいずれかに記載の測定方法。

10. 該補間法は、リニア補間であることを特徴とする請求項9に記載の測定方法。

11. 該補間法は、放物補間タイプであることを特徴とする請求項9に記載の測定方法。

12. 該補間法はシンプソン補間法であることを特徴とする請求項11に記載の

測定方法。

13. 電気泳動法に使用される支持ゲルは、各々、分離される時間原点を有する測定レーンの連続であり、その方法は、サイズ標準値のための係数A、B、Cを計算し、その後、サイズ標準値により得られた t_i 位置の補間を行ない、次に、各々の移入の時間原点の対して、測定レーンの上で、各々の相当する係数A、B、Cを計算する工程よりなることを特徴とする請求項1～12のいずれかに記載の測定方法。

14. センサから導かれた曲線は、好適には、1ファイル／1測定レーンの割合で、貯蔵されることを特徴とする請求項1～13のいずれかに記載の測定方法。

15. センサから導かれた曲線は、フィルタリングにかけられることを特徴とする請求項1～14のいずれかに記載の測定方法。

16. フィルタリング段階は、低パス フィルタリングであることを特徴とす

る請求項15に記載の測定方法。

17. フィルタリング段階は、ランクゾスフィルタリングであることを特徴とする請求項15或いは16に記載の測定方法。

18. 更に、ベースラインを、測定曲線から減算する段階を有することを特徴とする請求項15～17のいずれかに記載の測定方法。

19. 免疫システムのレパトリを記述する方法のフレーム枠内で行なわれ、2つの軸は、V及びJプライマーに相当しており、一方、第3の軸は、検知したDNAフラグメントのサイズ値に相当している3次元マトリックスの形でレパトリを可視化し、そして、更に、マトリックスの各区域J／サイズ上に可視化する前に、Jプライマーの収率の関数として測定された値を標準化する

段階を有することを特徴とする請求項1～18のいずれかに記載の測定方法。

20. マトリックスの表示を行なう前に、測定された値を、1つの区域J／サイズから他の区域J／サイズへ、標準化することを特徴とする請求項19に記載の測定方法。

21. DNAフラグメントに相当する信号のピークが、マニュアルで取得されることを特徴とする請求項1～20のいずれかに記載の測定方法。

22. DNAフラグメントに相当する信号のピークが、自動的に取得されることを特徴とする請求項1～20のいずれかに記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】**DNAフラグメントのヌクレオチドのサイズの測定方法****発明の技術分野**

本発明は、DNAフラグメントのヌクレオチドサイズを測定することを可能にする方法に関する。

本発明による方法は、ゲル電気泳動法によりDNAフラグメントを分離する方法を利用するものである。

発明の背景分野

ラベルされたDNAフラグメント、例えば、蛍光マーカーでラベルされたものを、ゲル電気泳動法で分離し検知することは、当業者にとり周知のものである。

これらの機能を果たすことができる種々の装置は、市場に知られている。これらの既知の装置のなかで、アプライド バイオシステム社からの373Aとして市販されている自動化DNA連鎖決定のための自動化ゲル電気泳動装置が記述されている。この装置は、米国特許第4,811,218号に記載されている。

ゲル電気泳動法によるDNAフラグメントの分離のための既知装置は、一般的に次のようなものを備える。

—例えば、予めラベルされたDNAサンプルを受け入れることができるポリアクリルアミド或いはアガロースにより作成されたゲルよりなる移入のための平らな支持体

—電気泳動法によるDNAフラグメント分離を行なうための支持体ゲルの端部の間を接続する、典型的には、1000～1500Vの高電圧連続電力源

—後者の基礎に置かれた、支持体ゲル上に次々に移入されるDNAフラグメントの検知器具

—検知器具から出力されたデータを記録し及び処理するための器具。

DNAサンプルは、当業者に周知の種々の技術により作成される。

これらの作成技術は、一般的には、単一ストランドの、或いは二重ストランドのDNA核酸配列を、試験管内で、酵素を利用する方法で、即ち、特に、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）により、或いは、SDA（ストランドディスプレイ

メントアンプリフィケーション：Strand Displacement Amplification) 技術により、行なわれる。

試験管内での増幅反応技術は、特に、PCR 或いは SDA によるものは、文献に説明されている。特に、ヨーロッパ特許公報 201 184 及び 200 362 に、PCR の基礎技術について説明されている。所謂、SDA 増幅技術は、1991 年 11 月 20～22 日に開催された核酸についてのサンチャゴ大会中に、説明された。

これらの酵素 DNA 増幅方法において、配列の増幅は、連鎖サイクルにより行なわれる。

各サイクルは、数段階を有する：

- それらを補間する DNA フラグメントの 5' 末端に、特定のオリゴヌクレオチドプライマをハイブリッド化する段階、そして、
- プライマの 3' 末端から、DNA ポリメラーゼの助けにより拡張させる段階。

DNA フラグメントのための掛算因子は、各サイクルでの理論上 2 である。

PCR-タイプ酵素 DNA 増幅技術において、サンプルは、各サイクルの終わりに熱変成される。熱安定性のポリメラーゼ、例えば、Taq ポリメラーゼを使用すると、種々の段階は、その操作温度のみ異なる自動化サイクル機（熱変成／アニール／酵素重合化）を操作することが可能になる。変成条件は、一般的に、90℃以上に反応媒体の温度を上昇させること、そして、アニールは、50～70℃の間で行なわれ、DNA ポリメラーゼによる拡張は、比較的に高温で行なわれ、熱安定性 DNA ポリメラーゼを使用する場合、70℃のオーダーである。

他方、他の酵素的 DNA 増幅技術、例えば、SDA 技術のようなものでは、各サイクルの終端で得られた生成物は、熱変成されない。それらは、等熱的な方法である。

SDA 増幅方法は、制限酵素、例えば、酵素 Hinc II により認識された DNA 配列の添加により、5' 位で変成されたオリゴヌクレオチド プライマの使用に基づく。この方法は、硫黄-含有のデオキシアデノシン 三リン酸塩を結合されることによりチオ化された制限位を形成する必要がある、部分的に水和させる（単

一ストランド上で)、該Hinc II酵素の反応を必要として、更に、新規なストランドを、水和点から合成するDNAポリメラーゼを必要とし、従来カットする核酸配列の同時配置変えを伴い、そして、変成は必要でない。変更されたプライマを、目的点まで、アニールすることは、DNAの変成の第1段階のみを必要とする。従って、反応は、37℃で生じる。

フラグメントのラベル化は、一般的に、少しの更なる増幅サイクルを助けて、放射線元素でラベルを示すプライマオリゴヌクレオチドの存在下で、行ない、或いは、酵素ラベル化或いは好適には、発蛍光体に基づく蛍光ラベルするものである。

移入-支持体ゲルは、一般的に、数個の平行レーン、例えば、24個のレーンを有する。

発蛍光体に基づいた蛍光ラベルの好適な場合には、検知器具は、励起のためのシステム（例えば、レーザ或いはハロゲンランプ）及び励起されたサンプルにより生成された蛍光放射線に敏感なセンサを有する。ある装置では、ミラー具を、ゲルのベースの反対側に往復運動し伝送運動が得られる担体上に置き、励起放射線を、サンプル上に反射させ、蛍光放射線を、センサに反転させる。

他の装置においては、励起放射線は、ゲル厚に直接に送られ、電気泳動の方向に直角に、そして、ゲル平面に平行に送られる、一方、センサ列は、蛍光信号を収集している。

センサは、この振幅が、特定閾値より小さくするという条件において、その振幅が検知された蛍光色素の濃度に比例する信号を配分する。

更に、特定の装置に対して、異なる”色素”の4つの発蛍光体を同時に使用することは、周知であり、それは、各レーンで、4つの異なるラベルされたサンプルを置くことを可能にする。

そのために、モニターされたフィルター組、例えば、センサの上流で、連続的に運動する4つのフィルターを有する車輪を有することが単に必要であり、それにより、各、放射線を連続的に検出し、そして、各サンプルを検出する。

本発明は、例えば、フランスに、1991年9月1日出願した特許出願第9

1 00189号に記載されている免疫システムのレパートリを説明する方法を利用するものである。

この方法は、基本的に次のものを特徴とする。

- 生物学的なサンプルで開始し、含有するmRNAの逆転転写を行なう。
- 転写生成物上に（サンプルから抽出したDNA上に直接に）、問題のレパートリ及び問題のレパートリの一定のセグメントでアニールするCの種々のセグメントに相当する各プライマ対V、C、Vに対して、増幅物を分離する。
- 各々のこれらの増幅生成物に対して、各、レパートリのセグメントJに、ラベルされ、このセグメントJとテンプレートとして増幅生成物に特定されるオリゴヌクレオチドを、プライマとして使用する拡張工程。
- 得られたトリプレットV、C、Jに相当する各拡張生成物に対して、種々の生成物のサイズ及び量が示される。
- レパートリの説明は、トリプレットV、C、Jに相当するレパートリの各々の要素のために、行なわれ、該レパートリ中のこの要素の量の測定により、要素のサイズに相当するレパートリの各々のために行なわれる。

免疫システムのレパートリを説明するこの方法を適切に理解するに有利な方法は、フランス特許出願第91 00189号に記載されている。

本発明は、関心のDNAフラグメントを、1991年11月15日にフランスに出願した第91 14089号特許出願の明細書に記載される定量的な増幅法により、測定する方法を参照する。

この方法は、本質的に、次のことを特徴とする。

- 1) 関心のDNAフラグメントを含有する分析すべきサンプルに、関心のDNAフラグメントとは異なるが、同じプライマ オリゴヌクレオチドにより増幅される標準的DNAフラグメントを添加する。標準的DNAフラグメント及び関心のDNAフラグメントは、配列が異なり、そして/或いは、サイズは、約10%以内で、好適には、1ストランド当たり5以下のヌクレオチド、異なる。
- 2) 関心のDNAフラグメント及び標準的DNAフラグメントは、同じプライマオリゴヌクレオチドと、共増幅され、好適には、これらのDNAフラグメントの

混合物を増幅し、飽和まで行なう。

3) 段階2) で得られた反応媒体に、関心のDNAフラグメントと標準的DNAフラグメントに特定され、そして、段階2) の該プライマ オリゴヌクレオチドとは異なる1以上のラベルされたプライマオリゴヌクレオチドを添加し、そして、1以上の更なる増幅サイクルを、該ラベルされたプライマ オリゴヌクレオチドで行なわれ、サイクル中で、DNAの変成後、該ラベルされたプライマ オリゴヌクレオチドは、適当な位置で、該フラグメントで、アニールされ、それにより、DNAポリメラーゼによる拡張が、異なるサイズ及び/或いは配列のラベルされたDNAフラグメントを生成し、或いは、関心のDNAフラグメントから、或いは標準的DNAフラグメントから、各々、得られるか否かに依存する異なるマーカーにより、行なわれる。次いで、

4) 関心のDNAフラグメントを最初に量的に測定し、それは、初期の標準的なDNAフラグメントの生成物として、関心の増幅されたDNAフラグメントの量と、増幅された標準的なDNAフラグメント量との間の比率として測定され、そして、各々、関心の増幅されたDNAフラグメントと段階3) で得られた標準的なDNAフラグメントから得られた、ラベルされたDNAフラグメントの量のものと等しい比率を測定する。

特別の具体例によると、上記の方法の最後の段階を決めることは、次のように行なう。

—関心のDNAフラグメント及び標準的なDNAフラグメントを増幅してから、得られたラベルされたDNAフラグメントを、ゲル電気泳動法により、そのサイ

ズに従って、分離し、次いで、

—関心のDNAフラグメント及び標準的なDNAフラグメントから各々得られたラベルされたDNAフラグメントのための各々のプライマに対するマーカーに相当する信号の強度を検知する。

このフランス特許出願第91 14089号での記載からは、関心のDNAフラグメントの量を測定する方法を、適切に理解することができ、そして、それを参照できる。

既知の技術においては、DNAフラグメントのヌクレオチド サイズが、本当に基本的な方法で評価され、検知サンプルの位置を、ラベルされたサイズ標準値の位置と関連させて、そのラベルされたサイズ標準値の位置は、支持体ゲル上にコード配置され、測定されるべきサンプルと同じ電気泳動にかけられるものである。

発明の概要

本発明の目的は、DNAフラグメントのサイズを、より詳細に測定できる新規な手段を提供することにより、従来技術を改良することである。

この目的は、本発明により、以下のものよりなる段階を有する方法により、達成される：

- i) 各、検知されたDNAフラグメントに対して、予め決めた定数長に、移入時間を測定し、そして、
- ii) 各々、検知したDNAフラグメントのサイズを、その移入時間で校正する。

発明の詳細な説明

本発明の長所によると、各、検知DNAフラグメントのサイズとその移入時間との間で校正（コレレイション）は、次の法則に基づいて確立される。

$$L(t) = A \exp \left[-B / (t + t_0) \right] + C$$

（但し、A、B、Cは、定数であり、tは、移入時間を示し、時間定数を表示する。L(t)は、検知されたDNAのヌクレオチドの長さを示す）

本発明の他の特徴、目的及び長所は、詳細な下記の説明から、分かり、そして、その添付図に関連している。

図面の簡単な説明

図1は、本発明により方法での一般的な概略流れ図を示す。

図2～7は、本方法での流れ図の特定な段階の形で示すものである。

図8は、以下の明細書に記載されるすべての段階での校正する一般的な流れ図を示す。

上記に示されるように、本発明による方法は、DNAフラグメントのヌクレオチドサイズを測定するようになっており、ゲル電気泳動法によるDNAフラグメント分離方法を利用する。

この分離方法は、既知であるが、従って、上記のように、その本質的な特性は、以下の明細書に詳細に説明される必要はない。

上記に述べるように、本発明は、既知のサイズの標準値が支持体ゲル上にコード配置される方法を利用する。好適には、既知サイズの標準値は、3つのコントロールレーン上に、即ち、支持体ゲルの2つの側面端及びその中心に、配置される。

特に、本発明は、既知のサイズの標準値が、支持体ゲル上にコード位置されたものである方法を利用する。好適には、既知サイズの標準値が、3つのコントロールレーン上に、即ち、支持体ゲルの2つの側面端上と、その中心に、析出される。

支持体ゲルの各コントロールレーン上にコード配置されたサイズ標準値の数 n は、使用者により選択できる。然し乍ら、好適には、5つのサイズ標準値が、各コントロールレーン上に配置される。

限定的でない実施例により、これらの5つの既知サイズの標準値は、各々、96、114、140、157及び176のヌクレオチドである。

- 図1に概略されるように、本発明の方法は、好適には、
- a) ラベルされたDNAサンプル及びゲル上にコード配置されたラベルされたサイズ標準値をゲル電気泳動を行なう(図1の段階100)；
 - b) 検知器具のセンサから出力された信号を検出し、記録し(図1の段階200)；
 - c) 測定したデータをフィルタリングし(図1の段階300)；
 - d) 検出されたDNAフラグメントのサイズを測定し(図1の段階400)；
 - e) 得られた結果を可視化する(図1の段階500)。

好適な場合、フィルタリング段階300は、記録段階200の前に、行なうことができる。

好適には、段階200で、センサからの出力の曲線が、各、測定レーン当りの1ファイルの率で、各々の特定のファイル中に記録される。

フィルタリング相300は、好適には、図2に概略されるように、ランクゾス

(Lanczos) の重畳により変成された低パスフィルタリングの最初の段階 2 1 0 を有し、好適には、調整できるカットオフ周波数及び調整できるウィンド幅を有するフィルターの助けにより、高周波数雑音を除去する。

ランクゾスのウィンドの幅も調整できる。

最後に、フィルタリング相 3 0 0 は、どの点でも得られたベースラインを、フィルタされた曲線の最小値として、測定されたウィンド値で、減算するための最終段階 3 2 0 を有する。

このウィンド幅は、勿論、ピーク幅より相当に大きいものであり、好適には、このウィンド幅は調整できるものである。

検知された DNA フラグメントのサイズを測定するための段階 4 0 0 が、以下説明される。

上記のように、本発明によると、DNA フラグメントのサイズの測定のための

原理的な段階は、各、検知された DNA フラグメントの移入時間を測定した後、各、検知された DNA フラグメントのサイズ L を、次の式を助けて、その移入時間と比較するものである。

$$L(t) = A \exp \left[-B / (t + t_0) \right] + C$$

(但し、 A 、 B 、 C は定数であり、 t は、移入時間を示し、時間定数を表示している)。

より精密には、図 3 に概略するように、段階 4 0 0 は、次のものよりなる。

- a) その移入時間 t_i を測定したサイズ標準値 (図 3 の段階 4 1 0) を含有する各コントロールレーンに対して、係数 A 、 B 、 C を測定し；
- b) 測定レーンに対して、コントロールレーン中測定した移入時間 t_i を内挿し (図 3 の段階 4 2 0) ；
- c) この内挿から、パラメータ A 、 B 、 C の値を、各測定レーンに対して、測定し (図 3 の段階 4 3 0) ；
- d) 各、ゲルレーンについて確立した上記の法則 (図 3 の段階 4 4 0) に基づいて、DNA フラグメントのサイズを測定する。

段階 4 1 0 は、図 4 の流れ図の形に示される。

この段階410は、相当するファイルでのiサイズ標準値の取得のための段階411から開始される。この段階411は、その詳細は、図5に示されるが、次のように行なわれる。

第1の相4110では、装置は、欠陥により固定されるが、使用者により変更できる測定ウィンド中で、i放射線ピークを自動的に調査する。この調査は、測定された強度ピークを、iピークが得られるまで徐々に低減される（段階4112）閾値と比較する（段階4111）ことにより行なわれる（段階4113）。

上記の第1の相4110が、所望のiピークを得ることを可能にする場合、装置は、第2相4114まで、通過せしめ、そこでは、使用者が、段階4115でウィンド幅を変更し、上記の自動的調査相4110を再スタートさせるか、或いは、

既知の手段（例えば、スクリーン上を動くポインターの助けで）で、所望のピークを、スクリーン上に可視化した測定曲線の再表示する上で、同定することにより、マニュアルでサーチを行なう（段階4116）ことができるというものである。

図4に示されるように、サイズ標準値が、自動的に、或いはマニュアルで、段階411で、標準値の取得のために、同定すると、この段階は、既知長さ L_i の標準値の移入 t_i を測定するための段階412に後続され、そして、この測定に基づいてそれらの標準値に対して係数A、B、Cを計算する段階413になる。

段階412で測定されたサイズ標準値の移入時間 t_i は、時間原点からの、支持体ゲルのベースで置かれた検知器具のセンサに届くに必要な時間に相当する。

この時間原点は、時間定数が零である場合の、電気泳動の開始点に相当する。

時間原点は、電気泳動の開始後に、その場合、その時間定数は、電気泳動の開始と考慮される時間原点との間の間隔に等しいものである。従って、使用者は、一度、そして、すべてに、このパラメータの値を導入する。従って、 $t_0 = 0$ を、表示モードを単純化するに使用する。

段階413は、図6に示される。

段階413では、係数A、B、Cを、次の最小平方誤差関数により、先ず計算する。

$$f(A, B, C) = \sum_{i=1}^n [L_i - (A \exp(-B/t_i) + C)]^2$$

(但し、nは、標準DNAフラグメントの数である)

この関数 $f(A, B, C)$ の A 、 B 、 C に対する部分偏差半数が、零である；係数 A 、 B 、 C の値を調査することにより、計算される。

B のみの関数としての1つが、このようにして得られた3つの式のシステムは：

$$\sum_{i=1}^n [L_i - L] \exp(-B/t_i) \times$$

$$\frac{\sum_{i=1}^n (\exp(-B/t_i) - \exp(-B/t)) \exp(-B/t_i) 1/t_i}{\sum_{i=1}^n [L_i - L] \exp(-B/t_i) 1/t_i} \times$$

$$\frac{\sum_{i=1}^n (\exp(-B/t_i) - \exp(-B/t)) \exp(-B/t_i)}{\sum_{i=1}^n [L_i - L] \exp(-B/t_i)}$$

$$A = \frac{\sum_{i=1}^n [L_i - L] \exp(-B/t_i)}{\sum_{i=1}^n \exp(-B/t_i) - \exp(-B/t)} \exp(-B/t_i)$$

$$C = 1 / n \sum_{i=1}^n [L_i - A \exp(-B/t_i)]$$

(但し、

$$\overline{X(t)} = (1/n) \sum_{i=1}^n X(t_i)$$

は、 $X(1)$ 、 \dots 、 $X(n)$ の平均値である。))

第1の上記の式は、定数Bの値を測定することを可能にする。

そして、定数Bを得るとき、定数AとCは、最後の2つの上記の式に基づいて得られる。

係数A、B、Cが、種々の標準レーンに対して段階4130で得られたときに、A、B、C値は、関数 $f(A, B, C)$ 或いは $L(t) = A \exp[-B/(t+t_0)] + C$ の関数の段階4131に適用され、このように測定された理論的サイズと既知の固定値 L_i の間の差は、ベースの予め決めた数に等しい所定の閾値よりも小さいものである標準値の各々の既知固定の値 L_i に対してチェックすることができる(段階4132)。

このような場合では、本発明による方法は補完段階420により続けられる。

また、このような場合ではないとき、係数A、B、Cの計算は、ベースの予め決めた数により決められた閾値を変更した後に、段階4133での使用者により、最適化のために、繰り返す。

補完段階420の目的は、標準レーンのために測定された各レーンに基づいてサンプルを測定するための各レーンに対する標準でないマーカーのための移入時間 t_i の値を決めるためである。

補完段階420の目的は、支持ゲル幅に沿った移入パラメータの分散による測定誤差を低減させるためである。

これは、リニア補完法である。

然し乍ら、本発明の枠組内で、放物線タイプ補完法を行なうことができ、例えば、シンプソン補完法を行なうことができる。放物線タイプ補完法では、リニア補完よりも、より精密な結果を得る。

最後に、段階420において、係数A、B、Cの値は、補完法から得られた t_i 値から各測定レーンで、測定され、上記の式の助けにより、これを決める。

實際上、すべてのサンプルは、ゲル上に同時に測定できないという要件がある。ほとんど、支持ゲルは、共通の時間原点を有する偶数のレーンと、共通の時間原点を有する非偶数のレーンを有するが、偶数のレーンに対応する時間で分割される。

この場合、サイズ標準値は、種々の測定レーンと同じ原点での各々の支持ゲル上にコード位置される。

従って、各々、偶数及び非偶数のレーンに相当する異なる原点を有するサイズ

標準値に対して、係数A、B、Cを計算することが必要であり、更に、各々、偶数及び非偶数の測定レーンに対して、各補完を行なうことが必要である。

即ち、段階4 1 0及び4 1 2は、各測定レーン原点に対して、繰り返す。

係数A、B、Cが既知であり、各測定レーンに対して、好適には、メモリしてある場合、段階4 4 0を行なう。

図7に示されるように、この段階4 4 0は、3つのサブ段階に、次のように、分割される：

a) DNAフラグメントに相当する測定信号のピークの取得。この取得は、測定信号の振幅を、閾値と比較することにより、自動的に行なうことができる。この閾値は、この閾値は、考慮されるウィンド幅と同様に、調整することができる。有用なピークの取得は、マニュアルで行なうことができる。従って、操作者は、上記のように、DNAフラグメントに相当する信号のピークをマニュアルで探し、図5に示されるように、標準値の取得のために、行なわれる。

b) 標準値のための段階4 1 2で上記のように、DNAフラグメントの移入時間の段階4 4 2で測定する。

c) 次の式に基づいて種々のDNAフラグメントのサイズの段階4 4 3で計算する：

$$L(t) = A \exp \left[-B / (t + t_0) \right] + C$$

結果を完全に計算するとき、その表示は、段階5 0 0で適当な形で、可視化できる。

例えば、フランス特許出願第9 1 0 0 1 8 9号に示される免疫システムのレ

パートリを記述する方法の枠組内で、結果は、2つの軸が、プライマーVとJに相当し、一方、第3の軸が、検知したDNAセグメントのサイズ値に相当している3次元マトリックスの形に示される。

マトリックスの区割J／サイズの種々のラインに相当している種々の分析サンプルは、1つのラインから他のラインで異なる各々のJプライマに相当する。こ

れらの種々のJプライマは、異なる収率を有する。従って、1つのラインより他のラインに表示される値を比較することを可能にするために、Jプライマの収率の関数として、測定された値は、可視化を行なう前に、標準化される。

同様に、Vプライマは、異なる収率を有する。従って、種々の区割J／サイズに表示される値を直接比較できるために、1つの区割から他の区割で測定される値は、好適には、表示を行なう前に、関心のあるDNAフラグメントの量を決めるについての、フランス特許出願第91 14089号に基板される方法により行なわれる定量測定法に基づいて、標準化される。

本発明は、DNAフラグメントのサイズの精密測定を、非常に改良することを、可能にする。

特に、電気泳動法で移入されたDNAフラグメントを、既知のコード位置された標準値と、当業界技術により、粗く比較すると、精度1～2%でDNAフラグメントの長さを知ることができるが、一方、本発明によると、測定精度は、0.3%のオーダーである。

勿論、本発明は、上記に記述した特定の具体例に限定されるものでなく、その精神に従う種々の例にできるものである。特に、上記のように、異なる波長を発するいくつかの発蛍光体を同時に使用する場合、色素の積層を解消する最初の方法により記述された方法を行なうことは、好適である。まったく、多重の発蛍光体の場合、検知された蛍光信号は、副色素チャンネルになるものであるが、センサの正面に位置するフィルターの不完全性により、そのものが、他の3つのチャンネルで、より基本的でない。これらの望ましくない信号をなくすために、記録されたデータは、pライン（pは、使用された発蛍光体の数を示す）とn点（nは、電気泳動中に行なわれた測定点の数である）のマトリックスを、装置の平方

マトリックス ($p \times p$) 特性で乗じることによる操作を行なうことができる。このリニア変換を行なうと、色素に対して、信号に望まないものが、實際上、完全に除くものである。

【図1】

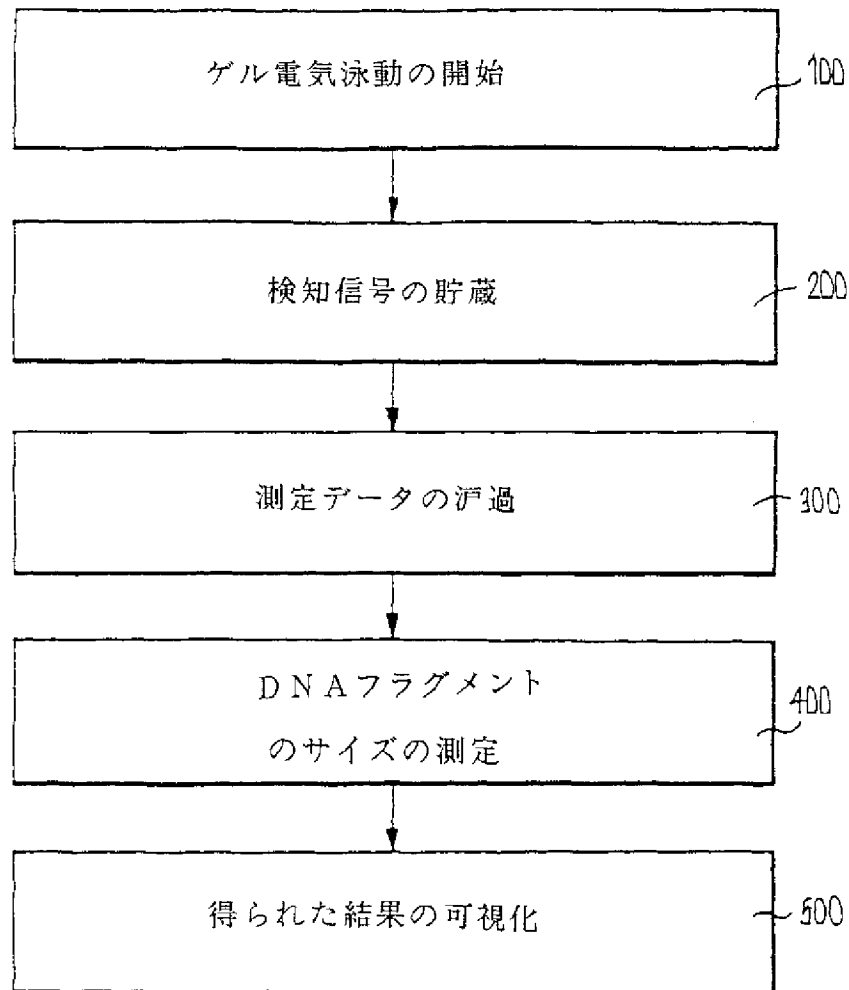
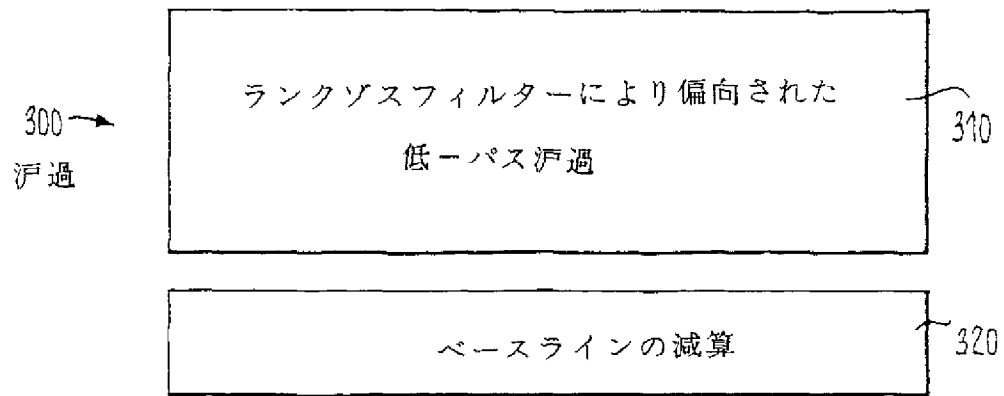


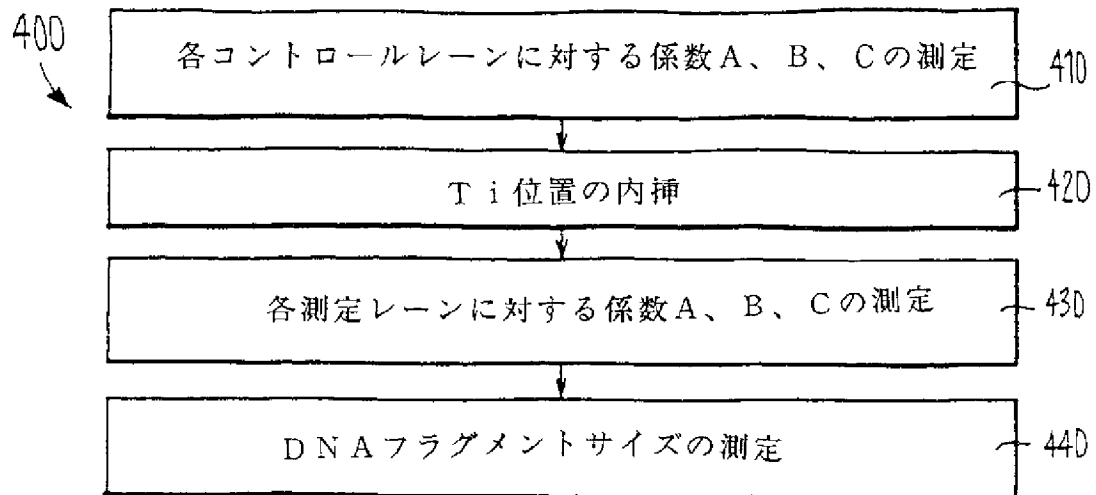
FIG.1

【図2】

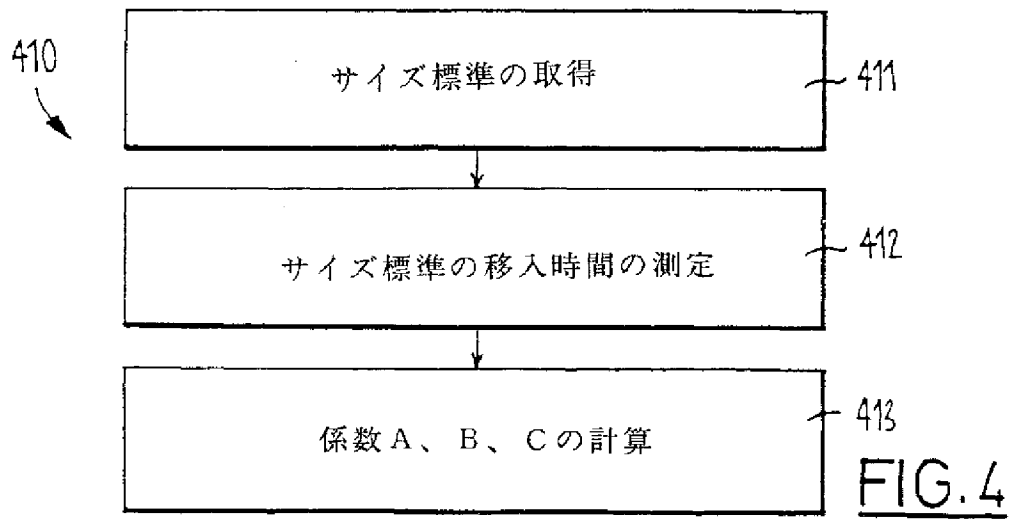
FIG. 2

【図3】

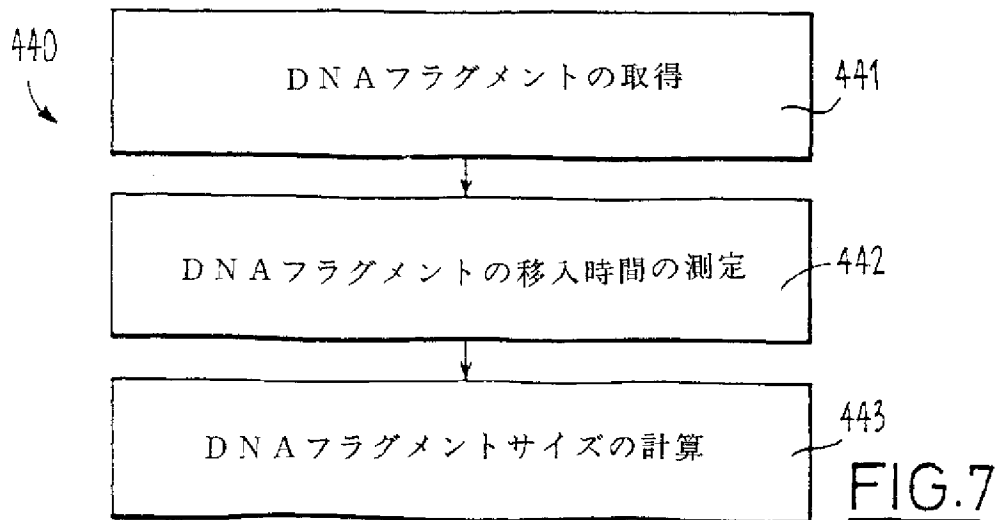
サイズ測定

FIG. 3

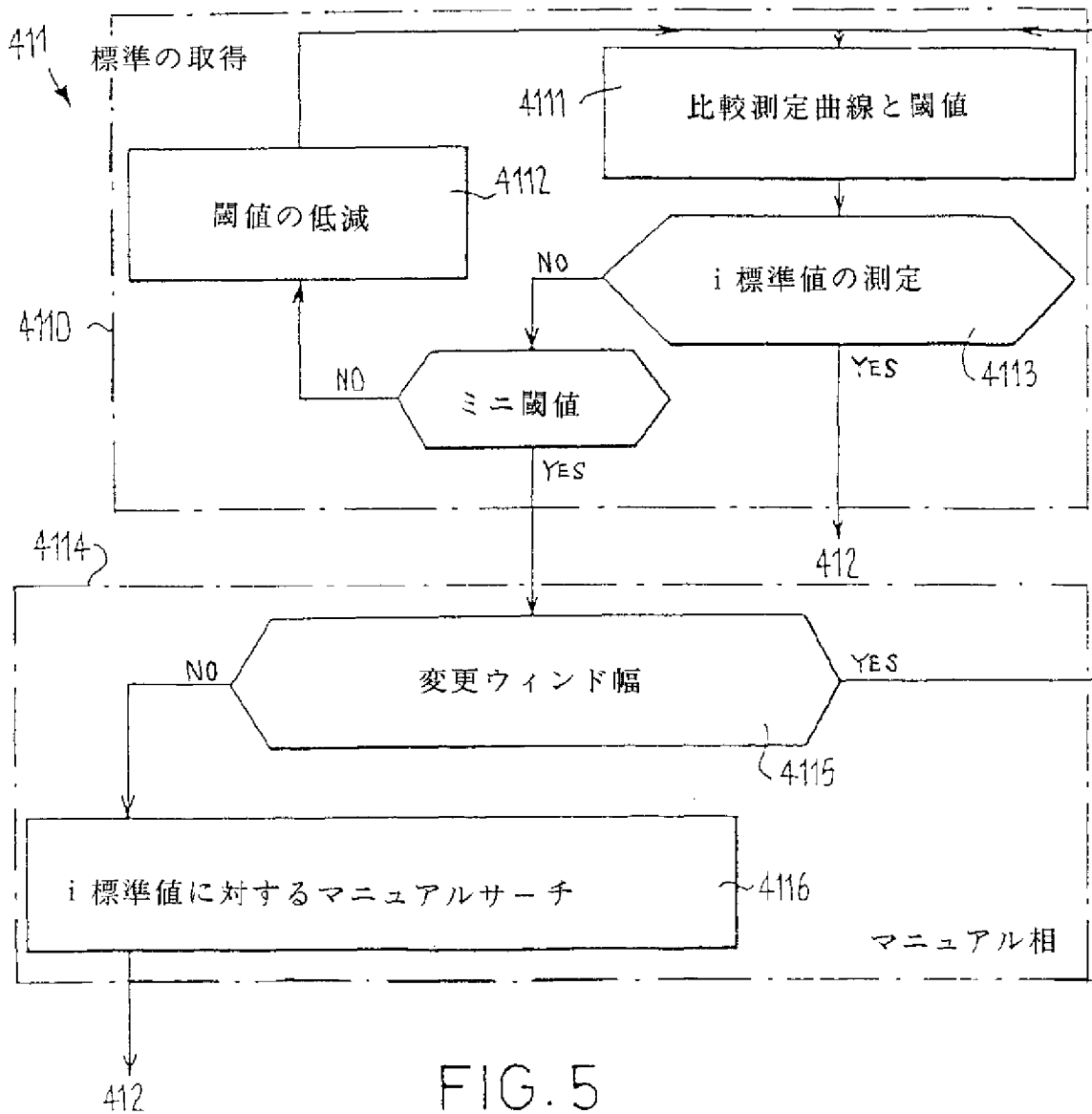
【図4】



【図7】



【図5】



【図6】

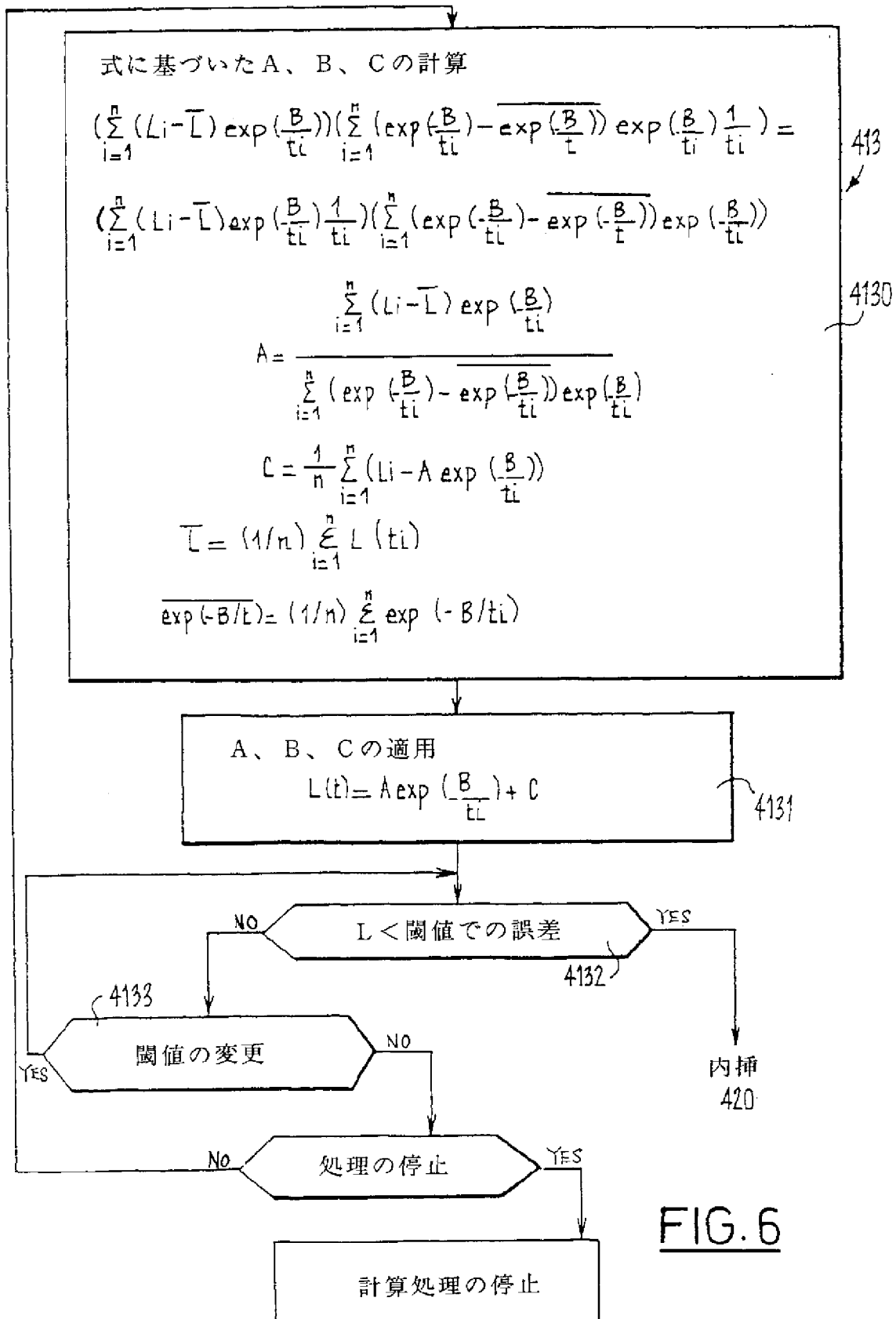
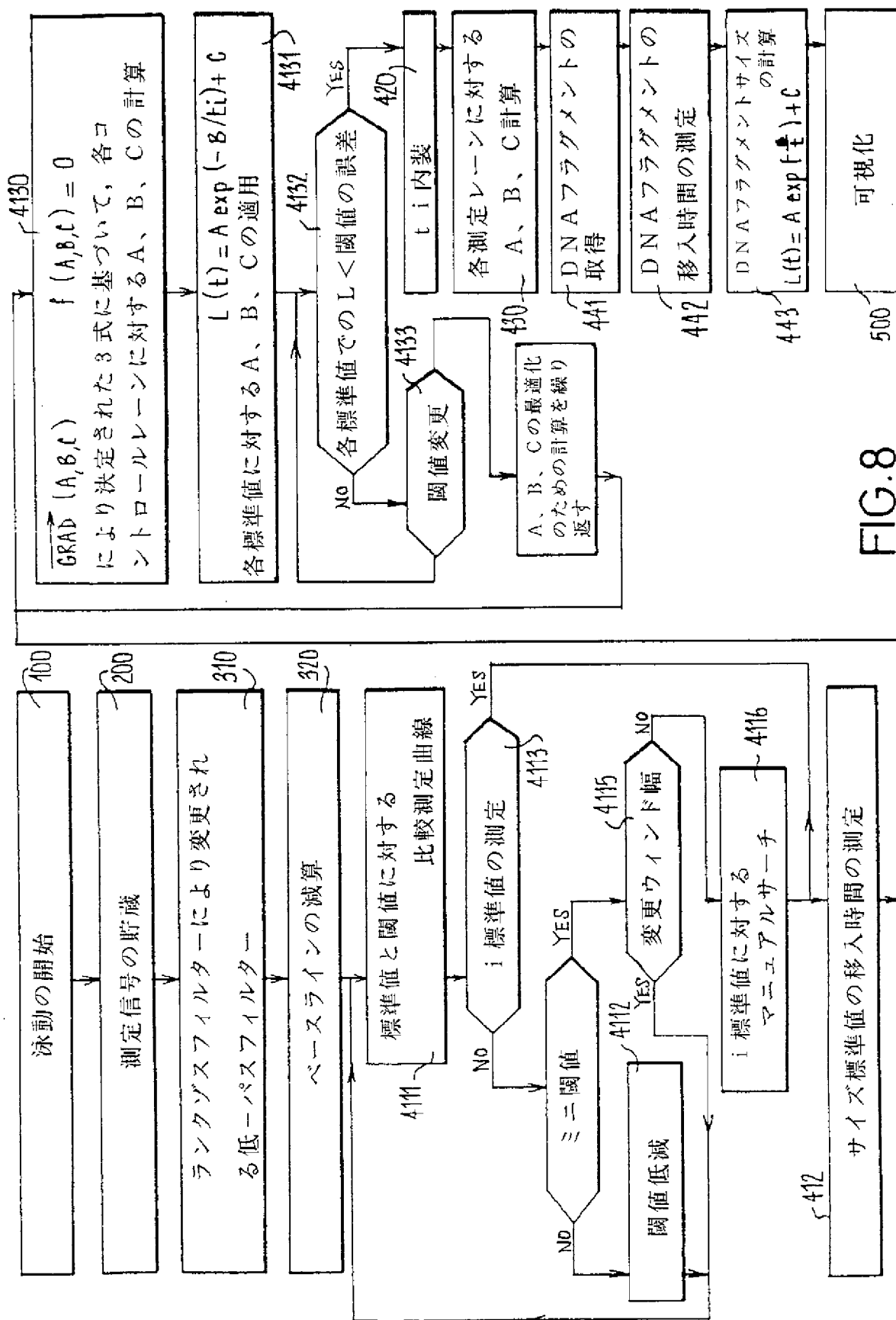


FIG. 8



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00675

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. ⁵ C12Q1/68 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int.Cl. ⁵ C12Q; G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	T.MANIATIS ET AL. (EDS.) "Molecular cloning. A laboratory manual" 1989, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK US see page 6.4 see figure 6.1	1-3
A	A.L.LEHNINGER "Biochemistry" 1975, WORTH PUBLISHERS, INC., NEW YORK US see page 174 - page 176 see page 180	1-3
A	DATABASE WPIL, Week 9151, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 91-371721 & JP, A, 3243857 (HITACHI KK) 30 October 1991 see abstract	1
		-/-
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
07 September 1993 (07.09.93)		01 October 1993 (01.10.93)
Name and mailing address of the ISA/ EUROPEAN PATENT OFFICE		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00675

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,9200796 (THE RESEARCH FOUNDATION OF THE STATE UNIVERSITY OF NEW YORK) 23 January 1992 *abstract* ---	1
A	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY Vol. 189, No. 2, 1 September 1990, NEW YORK US pages 235 - 243 K.E. OERTER ET AL. see the whole document ---	1-12
A	BIOCHEMISTRY Vol.22, No.26, 1983, EASTON US pages 6180-6185 N.C.STELLWAGEN see the whole document ---	1-12
A	US,A,4811218 (M.W.HUNKAPILLER ET AL.) 7 March 1989 cited in the application see column 2, line 55 - column 3, line 30 ---	1,5,6, 21,22
A	WO,A,9004648 (A.A.MORLEY) 03 May 1990 see the whole document ---	1,19-22
P,X	WO,A,9212260 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 23 July 1992 see the whole document & FR,A,2671356 cited in the application -----	1,19-22

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300675
SA 76831

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

07/09/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WD-A-9200796	23-01-92	US-A- 5215883 AU-A- 8238991	01-06-93 04-02-92
US-A-4811218	07-03-89	None	
WD-A-9004648	03-05-90	None	
WD-A-9212260	23-07-92	FR-A- 2671356	10-07-92

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号
7363－2 J

F I

G O 1 N 27/26

3 0 1 A